

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/001068

International filing date: 27 January 2005 (27.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-019251
Filing date: 28 January 2004 (28.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 03 March 2005 (03.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

09.2.2005

日本特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2004年 1月28日
Date of Application:

出願番号 特願2004-019251
Application Number:

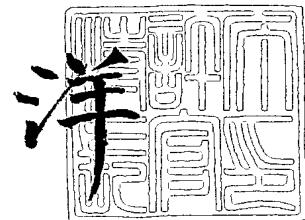
[ST. 10/C] : [JP2004-019251]

出願人 株式会社ミツカングループ本社
Applicant(s):

2005年 2月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P161440K
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A23L 1/222
C07K 14/415

【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県蕨市南町 1-16-15
【氏名】 阿部 啓子

【発明者】
【住所又は居所】 東京都杉並区高円寺南 3-14-11
【氏名】 朝倉 富子

【発明者】
【住所又は居所】 東京都北区豊島 8-8-16
【氏名】 反町 洋之

【発明者】
【住所又は居所】 愛知県半田市瑞穂町 10-7-3
【氏名】 山本 温子

【特許出願人】
【識別番号】 398065531
【氏名又は名称】 株式会社 ミツカングループ本社

【代理人】
【識別番号】 100074077
【弁理士】
【氏名又は名称】 久保田 藤郎

【選任した代理人】
【識別番号】 100086221
【弁理士】
【氏名又は名称】 矢野 裕也

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 009014
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1
【物件名】 図面 1
【包括委任状番号】 9900384

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

下記の（A）、又は（B）に示すポリペプチドN A S。

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(B) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、下記の（a）又は（b）に示すポリペプチドN B Sと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチド。

(a) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、クルクリンを構成するサブユニットとなりうるポリペプチド。

【請求項2】

マンノース／N-アセチルグルコサミン／フコース／キシロースの比が3／2／1／1で構成されるN結合型糖鎖が付加された請求項1に記載のポリペプチドN A S。

【請求項3】

下記の（A）、又は（B）に示すポリペプチドN A Sをコードする遺伝子のD N A。

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(B) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、下記の（a）又は（b）に示すポリペプチドN B Sと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチド。

(a) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、クルクリンを構成するサブユニットとなりうるポリペプチド。

【請求項4】

下記の（A）又は（B）に示すD N Aである請求項3に記載の遺伝子のD N A。

(A) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号70～408からなる塩基配列を含むD N A。

(B) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号70～408からなる塩基配列又は当該塩基配列の少なくとも一部から作成したプローブとなりうる塩基配列のD N Aと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、下記の（a）又は（b）に示すポリペプチドN B Sと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチドをコードするD N A。

(a) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、クルクリンを構成するサブユニットとなりうるポリペプチド。

【請求項5】

下記の（A）又は（B）に示すポリペプチドP N A S。

(A) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(B) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、プロセシングにより成熟体ポリペプチドN A Sとなった後に、下記の（a）又は（b）に示すポリペプチドN B Sと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチド。

(a) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、クルクリンを構成するサブユニットとなりうるポリペプチド。

【請求項 6】

マンノース／N-アセチルグルコサミン／フコース／キシロースの比が3／2／1／1で構成されるN結合型糖鎖が付加された請求項5に記載のポリペプチドP N A S。

【請求項 7】

下記の(A)又は(B)に示すポリペプチドP N A Sをコードする遺伝子のD N A。

(A) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(B) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、プロセシングにより成熟体ポリペプチドN A Sとなった後に、下記の(a)又は(b)に示すポリペプチドN B Sと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチド。

(a) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、クルクリンを構成するサブユニットとなりうるポリペプチド。

【請求項 8】

下記の(A)又は(B)に示すD N Aである請求項7に記載の遺伝子のD N A。

(A) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号4～477からなる塩基配列を含むD N A。

(B) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号4～477からなる塩基配列又は当該塩基配列の少なくとも一部から作成したプローブとなりうる塩基配列のD N Aと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プロセシングにより成熟体ポリペプチドN A Sとなった後に、下記の(a)又は(b)に示すポリペプチドN B Sと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチドをコードするD N A。

(a) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、クルクリンを構成するサブユニットとなりうるポリペプチド。

【請求項 9】

請求項1又は2に記載のポリペプチドN A Sと下記の(a)又は(b)に示すポリペプチドN B Sとからなり、味覚改変活性を有することを特徴とする二量体タンパク質ネオクリン。

(a) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、クルクリンを構成するサブユニットとなりうるポリペプチド。

【請求項 10】

請求項9に記載の二量体ネオクリンを有効成分として含有することを特徴とする味覚改変組成物。

【書類名】明細書

【発明の名称】新規味覚改変ポリペプチドNAS、そのDNA及びその用途

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規味覚改変ポリペプチドNAS、そのDNA及びその用途に関し、詳しくは、ポリペプチドNAS、その遺伝子、当該タンパク質を含有する味覚改変活性を有する二量体タンパク質ネオクリン、並びにネオクリンを含有する味覚改変組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

クルクリゴ・ラチフォリア (*Curculigo latifolia*) は、西マレーシアやタイ南部などに自生するユリ科に分類される植物であり、該植物に含有されるクルクリン同族体（アイソフォーム）（以下、クルクリンと称する。）は、これを食した後、水又は酸味物質を飲食すると、甘味を感じさせる味覚修飾物質として有用であるとされている。

【0003】

従来知られているクルクリンを構成するサブユニットとしては、クルクリンA、クルクリンB等がある。

クルクリンAについては、既に全アミノ酸配列が決定されている（例えば、特許文献1参照）。また、クルクリンBについても、全アミノ酸配列ならびに塩基配列が開示されており、クルクリンAとはアミノ酸組成において数個のアミノ酸が異なることが確認されている（例えば、特許文献2参照）。

これらのサブユニットは、いずれもヘテロダイマーとしてクルクリンを構成し、味覚修飾機能を有するとされていたが、これらの味覚修飾機能は食品に添加するには充分とは言えなかった。

このような状況下、より実用性の高い、優れた味覚改変機能を有する物質の解明が求められていた。

【0004】

【特許文献1】特開平3-190899号公報

【特許文献2】特開平6-189771号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、上記のように、より優れた味覚改変機能を有する物質を見出し、該味覚改変物質の構造を決定すると共に、遺伝子レベルにおいても解明し、当該物質の一次構造、並びにこれをコードする遺伝子を取得するとともに、当該味覚改変物質を含むことを特徴とする新規な味覚改変組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは上記課題に基づき、鋭意検討を重ねた結果、クルクリゴ・ラチフォリア (*Curculigo latifolia*) の果実抽出物中に、優れた味覚改変活性を有し、クルクリンとは異なりヘテロダイマー構造を取る新規な二量体タンパク質を見出すことに成功し、該タンパク質をネオクリンと命名した。

このネオクリンは、飲食物の酸味、苦味又はえぐ味を顕著に低減すると共に、飲食物の嗜好性を高めるような活性、すなわち味覚改変活性を有し、クルクリンの味覚修飾作用よりも格段に優れ、実用性に優れていることを見出した。

【0007】

すなわち、本発明者らはネオクリンを精製し、その構造を決定する過程で、ネオクリンは、従来知られていない新規サブユニットNAS (*neoculin acid subunit*) と、クルクリンのサブユニットとして既知のクルクリンAやBといったサブユニットNBS (*neoculin basic subunit*)とのヘテロダイマーであることに着目した。

そこで、該新規サブユニットNASの構造解析を行った結果、NBSを構成する既知のクルクリンAやB同士の相同性と比較して、相同性の低い新規なポリペプチドを得ることができた。

また、ポリペプチドNASをコードする遺伝子のDNAの解析を行い、ネオクリンを遺伝子レベルにおいて解明した結果、NASの成熟体タンパク質のほか、シグナルペプチド及び延長ペプチドを含む前駆体タンパク質(PNAS)の塩基配列をも見出した。

更に、ネオクリンを実際に飲食物に添加して、味覚改変活性を有することを確認した。本発明は係る知見に基づくものである。

【0008】

すなわち、請求項1に記載の本発明は、下記の(A)、又は(B)に示すポリペプチドNASである。

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(B) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、下記の(a)又は(b)に示すポリペプチドNBSと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチド。

(a) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、クルクリンを構成するサブユニットとなりうるポリペプチド。

請求項2に記載の本発明は、マンノース/N-アセチルグルコサミン/フコース/キシロースの比が3/2/1/1で構成されるN結合型糖鎖が付加された請求項1に記載のポリペプチドNASである。

【0009】

請求項3に記載の本発明は、下記の(A)、又は(B)に示すポリペプチドNASをコードする遺伝子のDNAである。

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(B) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、前記の(a)又は(b)に示すポリペプチドNBSと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチド。

請求項4に記載の本発明は、下記の(A)又は(B)に示すDNAである請求項3に記載の遺伝子のDNAである。

(A) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号70~408からなる塩基配列を含むDNA。

(B) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号70~408からなる塩基配列又は当該塩基配列の少なくとも一部から作成したプローブとなりうる塩基配列のDNAと、ストリンジメントな条件下でハイブリダイズし、かつ、前記の(a)又は(b)に示すポリペプチドNBSと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチドをコードするDNA。

【0010】

請求項5に記載の本発明は、下記の(A)又は(B)に示すポリペプチドPNASである。

(A) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(B) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、プロセシングにより成熟体ポリペプチドNASとなった後に、前記の(a)又は(b)に示すポリペプチドNBSと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチド。

請求項6に記載の本発明は、マンノース/N-アセチルグルコサミン/フコース/キシロースの比が3/2/1/1で構成されるN結合型糖鎖が付加された請求項5に記載のポ

リペプチドP N A Sである。

【0011】

請求項7に記載の本発明は、下記の(A)又は(B)に示すポリペプチドP N A Sをコードする遺伝子のD N Aである。

(A) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(B) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、プロセシングにより成熟体ポリペプチドN A Sとなった後に、前記の(a)又は(b)に示すポリペプチドN B Sと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチド。

請求項8に記載の本発明は、下記の(A)又は(B)に示すD N Aである請求項7に記載の遺伝子のD N Aである。

(A) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号4～477からなる塩基配列を含むD N A。

(B) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号4～477からなる塩基配列又は当該塩基配列の少なくとも一部から作成したプローブとなりうる塩基配列のD N Aと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プロセシングにより成熟体ポリペプチドN A Sとなった後に、前記の(a)又は(b)に示すポリペプチドN B Sと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチドをコードするD N A。

【0012】

請求項9に記載の本発明は、請求項1又は2に記載のポリペプチドN A Sと前記の(a)又は(b)に示すポリペプチドN B Sとからなり、味覚改変活性を有することを特徴とする二量体タンパク質ネオクリンである。

請求項10に記載の本発明は、請求項9に記載の二量体ネオクリンを有効成分として含有することを特徴とする味覚改変組成物である。

【発明の効果】

【0013】

本発明により、優れた味覚改変活性を有し、クルクリンとは異なりヘテロダイマー構造を取る新規な二量体タンパク質ネオクリンが提供され、当該タンパク質を用いて、食品等に実用可能な新規な味覚改変組成物を提供することが可能となった。

また、本発明により、当該タンパク質を構成するサブユニットのアミノ酸配列が提供され、このアミノ酸配列通りに、適当な合成方法によって当該タンパク質を提供することが可能となった。さらには、本発明により、当該タンパク質をコードする遺伝子のD N Aが提供されたことで、適当な宿主を選び、遺伝子工学技術を用いても当該タンパク質を提供することが可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

(1) 本発明の二量体タンパク質ネオクリン

本発明のネオクリンは、ポリペプチドN A Sと下記の(a)又は(b)に示すポリペプチドN B Sとからなり味覚改変活性を有することを特徴とする二量体タンパク質である。

(a) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、クルクリンを構成するサブユニットとなりうるポリペプチド。

ポリペプチドN A S (neoculin acid subunit)については、下記の(2)で説明するように、本発明者らが初めて報告するタンパク質である。また、ポリペプチドN B S (neoculin basic subunit)とは、(a)又は(b)に示すポリペプチドを意味するが、これも後述の(2)で詳細に説明するように、具体的には、既知のクルクリンAやBといったクルクリンのサブユニットを意味する。

両者は、糖鎖で結合することにより安定なヘテロダイマーを形成する。

【0015】

本発明のネオクリンは、例えば、ユリ科に属する植物であるクルクリゴ・ラチフォリアから公知の分離・精製法を適切に組み合わせて取得できる。

例えば、実施例1の(1)に記載するように、凍結乾燥したクルクリゴ・ラチフォリアの果実をホモジナイズして得た粉末を大量の純水で抽出し、遠心分離によって上清を廃棄することにより、不要物を除去する。残った沈殿をpH 2.0以下の酸性水溶液で抽出すると、ネオクリンが抽出液中に得られる。次いで、この抽出液を通常の処理方法(好ましくは非加熱処理)で中和、濃縮、脱塩、乾燥すると、十分に実用可能なタンパク質ネオクリンが得られる。

尚、下記の(2)で説明するポリペプチドNASを人工的に作成し、これに、ネオクリン或いは既知のクルクリンから抽出・精製して得られる、或いは人工的に合成して得られるポリペプチドNBSを結合させることによっても得ることができる。

【0016】

本発明のネオクリンは、味覚改変活性を有するものである。ここで、味覚改変活性とは、酸味、苦味又はえぐ味を顕著に低減すると共に、飲食物の嗜好性を高めるような活性を言う。すなわち、苦味を有する飲食物の苦味を抑える活性、えぐ味を有する飲食物のえぐ味を抑える活性、飲食物に甘味を付与する活性、酸味を呈する飲食物に甘味を付与する活性、酸味を呈する飲食物の酸味を抑える活性を意味する。

【0017】**(2) 本発明のポリペプチドNAS**

本発明のポリペプチドNASは、下記の(A)、又は(B)に示すポリペプチドである。

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(B) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、下記の(a)又は(b)に示すポリペプチドNBSと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチド。

(a) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、クルクリンを構成するサブユニットとなりうるポリペプチド。

【0018】

本発明の(A)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、ポリペプチドNBSと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを構成するサブユニットの1つとして本発明者らが初めて見出したものである。

ポリペプチドNBS(neoculin basic subunit)とは、前記したように、(a)配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、或いは(b)配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個、好ましくは1~5個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、クルクリンを構成するサブユニットとなりうるポリペプチドを意味する。このようなポリペプチドNBSとして、具体的には、配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド(クルクリンB)、該アミノ酸配列中73番目のトリプトファンをアスパラギンに置換してなるポリペプチド(クルクリンB'を称する。)、該アミノ酸配列中、28番目のリジン、73番目のトリプトファン、78番目のトリプトファン及び81番目のアスパラギンを、それぞれアスパラギン、アスパラギン、システイン、及びアラニンに置換してなるポリペプチド(クルクリンA)を挙げることができる。

【0019】

従って、本発明のポリペプチドNASは、(A)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドであってもよいが、該(A)ポリペプチドと実質的に同一のポリペプチド、すなわち(B)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若し

くは数個、好ましくは1～5個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ポリペプチドNBSと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチドであっても良い。

【0020】

ポリペプチドNASは、ポリペプチドNBSとの結合力が増し、結果的に安定性の高いネオクリンを形成することができる点で、糖鎖が付加されてなることが好ましく、特に、N結合型糖鎖が付加されてなることが好ましい。ここでN結合型糖鎖とは、タンパク質の一次構造に存するアスパラギン残基に結合したN-アセチルグルコサミン (N-acetyl glucosamine) を基点として伸長する糖鎖構造の総称を意味する。

N結合型糖鎖の中でも、特に、マンノース (mannose) / N-アセチルグルコサミン (N-acetyl glucosamine) / フコース (fucose) / キシロース (xylose) の比が3/2/1/1で構成されるN結合型糖鎖であることが好ましい。具体的には、図8に示す構造からなる糖鎖配列を挙げることができる。尚、図8に示す構造の一部に付加、欠如、置換、又は修飾があつてもよい。

尚、ポリペプチドNASにおけるN結合型糖鎖の結合部位は、N結合型糖鎖の結合特性を考慮すると、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列中81番目のアスパラギンであるものと推測される。

【0021】

本発明のポリペプチドNASは、ネオクリンを形成するサブユニットであるから、ネオクリンを含むクルクリゴ・ラチフォリアの果実から公知の分離・精製法を組み合わせて取得することができる。例えば、実施例1の(1)に記載した方法で所得したネオクリンを、実施例1の(2)及び(3)に記載するように公知のイオン交換クロマトグラフィー法を適切に組み合わせて精製すると共に、実施例2に記載するように、通常用いられる方法で陽イオン交換カラムに供すると、等電点が8.6であるポリペプチドNBSはカラムに吸着され、ポリペプチドNASは非吸着画分に得られる。この非吸着画分を通常用いられる方法で、陰イオン交換カラムに供すると、等電点が4.7であるポリペプチドNASはカラムに吸着されるので、これを溶出し、脱塩、乾燥すればよい。

また、下記の(4)に示すDNAを元にして遺伝子工学的手法を用いて得ることができる。

一方、上記(A)又は(B)に示すポリペプチドを、適当な合成方法、例えば、固相合成法、部分固相合成法、溶液合成法のほか、フルオレニルメチルオキシカルボニル法(Fmoc法)、t-ブチルオキシカルボニル法(tBoc法)等の化学合成法などによって製造することができる。また、(B)に示すポリペプチドは、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個、好ましくは1～5個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を含むアミノ酸配列となるように、例えば部位特異的変異法によつて改変することによっても取得され得る。

【0022】

(3) 本発明のポリペプチドPNA S

本発明のポリペプチドPNA Sは、下記の(A)又は(B)に示すポリペプチドである。

- (A) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (B) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、プロセシングにより成熟体ポリペプチドNASとなった後に、前記の(a)又は(b)に示すポリペプチドNBSと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチド。

【0023】

ここで、(A)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、前記(2)において説明したポリペプチドNASのシグナルペプチド及び延長ペプチドを含むポリペプチドNASの前駆体として、本発明者らが始めて見出したものである。すなわち、(A)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、(A)配

列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの前駆体として植物細胞内で產生され、プロセシングによって、(A)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドとなるポリペプチドである。

従って、NAS前駆体であるポリペプチドPNASは、(A)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドであっても良いが、該(A)ポリペプチドと實質的に同一のポリペプチド、すなわち(B)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個、好ましくは1～5個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、プロセシングにより成熟体ポリペプチドNASとなった後に、ポリペプチドNBSと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチドであっても良い。

尚、ポリペプチドNBSについては、前記(2)において説明した通りである。

【0024】

ポリペプチドPCASはプロセシングにより、シグナルペプチド部分(配列表の配列番号3記載のアミノ酸配列のうち、塩基番号1～22記載のアミノ酸配列からなる部分)及び延長ペプチド(配列表の配列番号3記載のアミノ酸配列のうち、塩基番号136～158記載のアミノ酸配列からなる部分)が切断された後に得られるポリペプチドNASと、ポリペプチドPBSとの結合力を増加させ、結果的に安定性の高いネオクリンを形成させることができる点で、糖鎖が付加されてなることが好ましく、特に、N結合型糖鎖が付加されてなることが好ましい。N結合型糖鎖の中でも、特に、マンノース(mannose)／N-アセチルグルコサミン(N-acetyl glucosamine)／フコース(fucose)／キシロース(xylose)の比が3／2／1／1で構成されるN結合型糖鎖であることが好ましい。具体的には、図8に示す構造からなる糖鎖配列を挙げることができる。尚、図8に示す構造の一部に付加、欠如、置換、又は修飾があつてもよい。

尚、ポリペプチドPNASにおけるN結合型糖鎖の結合部位は、N結合型糖鎖の結合特性を考慮すると、配列表の配列番号3記載のアミノ酸配列中103番目のアスパラギンであるものと推測される。

【0025】

このようなポリペプチドPNASは、ネオクリンを形成するサブユニットNASの前駆体であるから、下記の(4)に示すPNASをコードする遺伝子のDNAを元にして遺伝子工学的手法を用いて得ることができる。一方、上記(A)又は(B)に示すポリペプチドを、適当な合成方法、例えば、固相合成法、部分固相合成法、溶液合成法のほか、フルオレニルメチルオキシカルボニル法(Fmoc法)、t-ブチルオキシカルボニル法(tBoc法)等の化学合成法などによって製造することができる。また、(B)に示すポリペプチドは、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個、好ましくは1～5個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を含むアミノ酸配列となるように、例えば部位特異的変異法によって改変することによっても取得され得る。

【0026】

(4)本発明のDNA

本発明のDNAは、上記(2)で説明したポリペプチドPNASをコードする遺伝子のDNA、及び、上記(3)で説明したポリペプチドPNASをコードする遺伝子のDNAである。

【0027】

すなわち、第一に、ポリペプチドNASをコードする遺伝子のDNAは、前記(2)において説明したポリペプチドNAS、詳しくは以下の(A)又は(B)に示すポリペプチドNASをコードする遺伝子のDNAである。

(A)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(B)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、前記の(a)又は(b)に示すポリペプチドNBSと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチド。

【0028】

このポリペプチドN A Sをコードする遺伝子のD N Aは、具体的には、(A)配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号70～408からなる塩基配列を含むD N Aとして得ることができるが、これと実質的に同一の塩基配列、すなわち、(B)配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号70～408からなる塩基配列又は当該塩基配列の少なくとも一部から作成したプローブとなりうる塩基配列のD N Aと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ポリペプチドN B Sと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチドをコードするD N Aとして得ることもできる。尚、ポリペプチドN B Sについては、前記(2)において説明した通りである。

ここで、「ストリンジエントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いD N A同士、例えば90%以上の相同性を有するD N A同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いD N A同士がハイブリダイズしない条件、あるいは、通常のハイブリダイゼーションの洗浄条件、例えば0.1×S Cで0.1%SDSに相当する塩濃度にて65℃で洗浄が行われる条件などが挙げられる。

【0029】

このような、ポリペプチドN A Sをコードする遺伝子のD N Aは、例えば、受粉から数週間後のクルクリゴ・ラチフォリアの果実から、m R N Aを抽出し、逆転写ポリメラーゼ・チェーン・リアクション(R T - P C R)によってc D N Aを合成し、ファージベクターにパッケージングする。これをファージに感染させc D N Aライブラリーを得る。続いて、本発明によって明らかとなったポリペプチドN A Sのアミノ酸配列に基づいて作製したプローブをプラーカハイブリダイゼーションさせて、目的とするD N Aを特定し、回収して取得することができる。

一方、配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号70～408からなる塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマーに用いたP C Rによって得ることもできるほか、市販されている種々のD N A合成装置によっても、上記(A)又は(B)に示すD N Aを合成することができる。

また、(B)に示すD N Aは、例えば配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号70～408からなる塩基配列に、部位特異的変異導入法等を用いて、適宜置換、欠失、挿入、又は付加変異を導入することで得ることができる。また、既知の突然変異処理によっても取得することが可能である。

【0030】

また、第二に、ポリペプチドP N A Sをコードする遺伝子のD N Aは、前記(3)において説明したポリペプチドP N A S、詳しくは以下の(A)又は(B)に示すポリペプチドP N A Sをコードする遺伝子のD N Aである。

(A)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(B)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、プロセシングにより成熟体ポリペプチドN A Sとなった後に、前記の(a)又は(b)に示すポリペプチドN B Sと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチド。

【0031】

このようなポリペプチドP N A Sをコードする遺伝子のD N Aは、具体的には、(A)配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号4～477からなる塩基配列を含むD N Aとして得ることができるが、これと実質的に同一の塩基配列、すなわち、(B)配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号4～477からなる塩基配列又は当該塩基配列の少なくとも一部から作成したプローブとなりうる塩基配列のD N Aと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プロセシングにより成熟体ポリペプチドN A Sとなった後に、ポリペプチドN B Sと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチド。

リンを形成しうるポリペプチドをコードするDNAとして得ることもできる。尚、ポリペプチドNBSについては、前記(2)において説明した通りである。

「ストリンジエントな条件」については、ポリペプチドNASをコードする遺伝子のDNAの場合と同様である。

【0032】

このような、ポリペプチドPNASをコードする遺伝子のDNAは、例えば、受粉から数週間後のクルクリゴ・ラチフォリアの果実から、成熟体ポリペプチドNASの場合と同様にして取得することができる。また、該配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号4～477に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマーに用いたPCRや、市販されている種々のDNA合成装置によっても、上記(A)又は(B)に示すDNAを合成することができる。

また、(B)に示すDNAは、例えば配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号4～477からなる塩基配列に、部位特異的変異導入法等を用いて、適宜置換、欠失、挿入、又は付加変異を導入することで得ることができる。また、既知の突然変異処理によっても取得することが可能である。

【0033】

なお、本発明の2つのDNAが、塩基配列の調整要素及び当該遺伝子の構造部分を含んでも良いことは、言うまでもない。

【0034】

(5) 本発明の味覚改変組成物

本発明の味覚改変組成物は、有効成分として、味覚改変活性を有する二量体タンパク質ネオクリンを含有することを特徴とするものである。ネオクリンについては、前記(1)において説明した通りである。

本発明の味覚改変組成物は、そのまま摂取してもよいが、野菜ジュース、グレープフルーツ等の果汁、すしネタ等各種料理用調味液をはじめとする飲食物又は薬剤等に適当量を配合して使用してもよい。この場合のネオクリンの配合量は、当該組成物が高度に精製されたネオクリン粉末を飲料に添加する場合を例に取ると、5～5,000μg/ml、特に50～500μg/mlが好ましい。

また、本発明の味覚改変組成物は、配合対象である飲食物又は薬剤等の性状に応じて、粉末状、溶液状、シート状、スプレー状、顆粒状、又は乳化物状等に加工して使用することができる。

以下に、実施例を示す。

【実施例1】

【0035】

クルクリゴ・ラチフォリアの果実を、以下の手順に従い精製し、味覚改変活性を有する新規タンパク質の取得を試みた。

【0036】

(1) 粗抽出液の調製

凍結乾燥したクルクリゴ・ラチフォリアの果実(表1の果実凍結乾燥粉末)約1kgに40リッターの純水を加え、15分間ホモジナイズした後、6,000rpmで20分間遠心分離を行い、上清(上清に味覚修飾活性は無い)を除去した。前述の操作を2回繰り返し、沈殿残渣を得た。

次に、この沈殿残渣に0.05N硫酸を20リッター加え、10分間ホモジナイズした後、6,000rpmで20分間遠心分離を行い、上清を回収した。この操作を2回繰り返した。沈殿に味覚修飾活性はない。

次に、この抽出液に1N水酸化ナトリウムを2リッター加え、中和して、活性物質を含む粗抽出液(表1の0.05N硫酸抽出液)を得た。

【0037】

(2) Amberlite IRC-50カラムによる精製

(1) 得た粗抽出液約40リッターを50mMリン酸緩衝液(pH5.5)で平衡化

したAmberlite IRC-50カラム（オルガノ社製、直径8cm×30cm）に流し、吸着させた。続いて、50mMリン酸緩衝液（pH5.5）1リッターで洗浄後、1M塩化ナトリウムを含む50mMリン酸緩衝液（pH5.5）1.5リッターで溶出したところ、味覚修飾活性を示す画分が得られた。この活性画分に60%飽和となるよう硫酸アンモニウムを添加し、活性物質を析出させ、6,000rpmで30分間遠心分離を行った。得られた沈殿は0.2N酢酸100mlに溶解し、活性物質溶液（表1のAmberlite IRC-50 Chromatography）として回収した。

【0038】

(3) Sephadex G-25カラムによる精製

(2)で得た活性物質溶液100mlを0.2N酢酸で平衡化したSephadex G-25カラム（Amersham Biosciences社製、直径8cm×30cm）に供し、脱塩した。この活性物質溶液を凍結乾燥することにより高度に精製されたネオクリン粉末（表1のSephadex G-25 Chromatography）が得られた。

上記の各精製ステップにおいて得られる物質のタンパク質含量、活性収率及び精製度を表1にまとめた。

【0039】

【表1】

	タンパク含量 (g)	活性収率 (%)	精製度 (倍)
果実凍結乾燥粉末	1000	100	1
0.05N硫酸抽出液	1.8	80	45
Amberlite IRC-50 Chromatography	3	55	185
Sephadex G-25 Chromatography	1	36	432

【0040】

(4) 精製結果の確認

前記の(1)～(3)で得たネオクリン精製粉末2.5μgを、還元下又は非還元下でゲル濃度15%でSDS-PAGE後、CBB染色を行ったところ、図1に示す通り、非還元下で20kDaの位置に単一バンドが見られ、還元下では13kDa及び11kDaの位置に2本のバンドが見られた。このことから、得られたネオクリンが高度に精製されていることが確認でき、さらに、ネオクリンが13kDa及び11kDaのサブユニット各1個からなる2量体であることが確認できたので、それぞれをneoculin acid subunit (NAS)、neoculin basic subunit (NBS)とした。

【0041】

(5) 味覚修飾活性の確認

さらに、前記の(1)～(3)で得たネオクリン精製粉末1.1mgを、6M尿素を含む10%アクリルアミドゲルを用いて、Native-PAGEを行った。得られたバンドを切り出し、ゲルから水で抽出した試料を凍結乾燥した。凍結乾燥後のサンプルを150μlの水に懸濁し、パネラー2名がそれぞれ50μlを口に含んだところ、当該サンプルが甘味を呈すること、さらに、サンプルを吐き出した後に口に含んだ0.02Mケン酸の酸味が甘味に変換されていることを確認し、味覚修飾活性を有することを確認した。

さらに、回収したサンプルのうち1000分の1量をSDS-PAGEに供して銀染色を行ったところ、20kDaの位置に単一バンドが見られ、味覚修飾活性本体がネオクリンであることが確認された。

【実施例2】

【0042】

実施例1において得られたネオクリンを、以下の手順に従い更に精製し、ネオクリンを構成する各サブユニットの解析を行った。

【0043】

(1) HiTrap SP Sepharose Fast Flowカラムによる精製
実施例1で得たネオクリン粉末100mgを20mlのバッファーA(8M尿素、30mM DTTを含む50mMトリスー塩酸緩衝液(pH7.5))に溶解し、全量をバッファーAで平衡化したHiTrap SP Sepharose Fast Flowカラム(Amersham Biosciences社製、直径1.6cm×2.5cm)に供した。続いて、バッファーA50mlで洗浄を行った。続いて、1M塩化ナトリウムを含むバッファーA50mlで溶出を行い、精製されたNBS画分を得た。また、洗浄画分70mlはイオン交換水中で透析により100mlとなった。

【0044】

(2) HiTrap SP Sepharose Fast Flowカラムによる2回目の精製

上記(1)で得られた洗浄画分100mlに8M尿素、30mM DTT、50mM酢酸緩衝液(pH4.5)を加え150mlとし(全て終濃度)、これをバッファーB(8M尿素、30mM DTTを含む50mM酢酸緩衝液(pH4.5))で平衡化したHiTrap SP Sepharose Fast Flowカラム(Amersham Biosciences社製、直径1.6cm×2.5cm)に供した。続いて、バッファーB50mlで洗浄後、1M塩化ナトリウムを含むバッファーB50mlで溶出を行った。また、洗浄画分200mlはイオン交換水中で透析により250mlとなった。

【0045】

(3) HiTrap DEAE Sepharose Fast Flowカラムによる精製

上記(2)で得られた洗浄画分250mlに8M尿素、30mM DTT、50mMトリスー塩酸緩衝液(pH9.0)を加え350mlとし(全て終濃度)、これをバッファーC(8M尿素、30mM DTTを含む50mMトリスー塩酸緩衝液(pH9.0))で平衡化したHiTrap DEAE Sepharose Fast Flowカラム(Amersham Biosciences社製、直径1.6cm×2.5cm)に供した。続いて、バッファーC50mlで洗浄後、1M塩化ナトリウムを含むバッファーC50mlで溶出を行ったところ、精製されたNAS画分を得た。

【0046】

(4) 精製結果の確認

(1)及び(3)で得られたNBS画分及びNAS画分をそれぞれ透析後、凍結乾燥し、精製粉末を得た。これらの精製粉末を10μg用いてSDS-PAGEを行ったところ、図2に示すように、NAS画分、NBS画分のそれぞれについて、13kDa、11kDaの部分に単一バンドが見られ、各サブユニットが精製されていることが確認された。

【実施例3】

【0047】

実施例2において得られたネオクリンを構成するNAS画分のアミノ酸配列を、以下の手順に従い解析した。

【0048】

(1) N末端アミノ酸配列解析

実施例2(1)～(3)で得られた精製NAS粉末70μgを二次元電気泳動に供し、電気泳動後のゲルをポリビニリデンジフルオライド(PVDF)膜と重ねて上下に電流を流すことにより転写した。転写したPVDF膜を、SYPRO Ruby protein blot stain(Molecular Probes社製)で染色後、通常の方法でバンドを切り出し、アミノ酸シーケンサー(HP G1005A Protein Sequencing System)によりN末端アミノ酸配列を決定した。すなわち、N末端部分の遊離アミノ基にフェニルイソチオシアネート(PITC)を反応させ、フェニルチオカルバミル誘導体(PTCアミノ酸)とし、次いでトリフルオロ酢酸によってアリノチアゾリノンーアミノ酸として遊離させ、さらに酸性下で安定なフェニルチオヒダントイン(PTHアミノ酸)に変換して分析するも

のである。これによりN末端より40残基のアミノ酸配列が決定された。

【0049】

(2) 内部アミノ酸配列解析

(i) S-カルボキシアミドメチル化

実施例2(1)～(3)で得られた精製NAS粉末10mgを6M尿素、20mMDTTを含む500mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)100mlに溶解した。この溶液を50℃、1時間静置した。ヨードアセトアミド100mgを添加して混合し、暗所、かつ室温で45分間振盪した。反応液を透析後、凍結乾燥させ、S-カルボキシアミドメチル化したNASを得た。

【0050】

(i i) chymotrypsinによる断片化

上記(i)で得られたS-カルボキシアミドメチル化NASのchymotrypsin消化を、0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)中で37℃、16時間行った。タンパク質濃度は0.2mg/mlで、酵素：基質比は1:20とした。反応停止には100℃で3分間処理した。

【0051】

(i i i) endoproteinase Asp-Nによる断片化

上記(i)で得られたS-カルボキシアミドメチル化NASのendoproteinase Asp-N消化を、0.01% SDSを含む50mMリン酸緩衝液(pH8.0)中で37℃、16時間行った。タンパク質濃度は1.0mg/mlで、酵素：基質比は1:100とした。反応停止には100℃で3分間処理した。

【0052】

(i v) trypsinによる断片化

上記(i)で得られたS-カルボキシアミドメチル化NASのtrypsin消化を、2M尿素を含む0.1M炭酸アンモニウム緩衝液(pH8.5)中で37℃、24時間行った。タンパク質濃度は0.2mg/mlで、酵素：基質比は1:20とした。反応停止には100℃で3分間処理した。

【0053】

(v) ペプチドの分離及び配列解析

上記(i i)～(i v)の操作で得られたchymotrypsin消化ペプチド、endoproteinase Asp-N消化ペプチド及びtrypsin消化ペプチドを、TSKgel ODS-80TsQカラム(東ソー社製、直徑4.6mm×15cm)を用いたHPLCによって分離した。各ペプチドは0.05%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法で溶出した。

220nmの吸収によって検知されたchymotrypsin消化ペプチドのHPLC溶出パターンを図3に、同様にして検知されたendoproteinase Asp-N消化ペプチドのHPLC溶出パターンを図4に、trypsin消化ペプチドのHPLC溶出パターンを図5に、それぞれ示す。

220nmの吸収によって検知され、分取されたペプチドは乾燥後、アミノ酸シーケンサー(Procise 491cLC Protein Sequencing System又はProcise 492HT Protein Sequencing System)により内部アミノ酸配列を解析した。

【0054】

(3) C末端アミノ酸配列解析

上記(2)(i)で得られたS-カルボキシアミドメチル化NAS 1nmolのcarboxypeptidase A消化を、0.15% SDSを含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)中で25℃で行った。タンパク質濃度は5mg/mlで、酵素：基質比は1:40とし、反応開始直後と6時間反応後にサンプリングした。反応停止には反応液に等量の10%トリクロロ酢酸を添加し、0℃、30分静置後、遠心分離して上清を回収した。

上清にある遊離したアミノ酸をPTC化し、TSKgel ODS-80TsQカラム

ム（東ソー社製、直径4.6 mm×15 cm）を用いたHPLCによって定量分析した。結果を図6に示す。

図6の結果から明らかなように、NASのC末端配列はC末端側からNLS P/Rであることが確認された。

【0055】

(4) 一次構造の決定

以上の方針により決定されたアミノ酸配列は、配列表の配列番号2及び図7に示す通りである。尚、図7において、4行目のNはN末端から決定したアミノ酸配列部分を示し、C1～14はchymotrypsin消化から得られたペプチドのアミノ酸配列部分を示し、D1～4は、endoproteinateinase Asp-N消化から得られたペプチドのアミノ酸配列部分を示し、T1～4はtrypsin消化から得られたペプチドのアミノ酸配列部分を示す。また、←はC末端から得られた配列を示す。

【実施例4】

【0056】

実施例2において得られたネオクリンを構成するNBS画分のアミノ酸配列を、実施例3と同様の手順に従い解析した。

その結果、NBSのアミノ酸配列は、配列表の配列番号6に示すアミノ酸配列からなり、特開平6-189771公報において既に開示されているポリペプチドであるクルクリンBのアミノ酸配列と完全に一致することが明らかとなった。

【実施例5】

【0057】

実施例2において得られたネオクリンを構成するNAS画分の糖鎖修飾について、以下の手順に従い解析した。

すなわち、糖鎖付加コンセンサス配列を有するペプチド、すなわち、実施例3(2)(ii)で得た精製NASのchymotrypsin消化ペプチドC1を回収し、ABE糖組成分析キットプラスS（ホーネンコーポレーション社製）を用いて、糖鎖の糖組成を分析した。

具体的には、シアル酸を遊離してから、還元糖に変換し、引き続き、酸加水分解により、糖タンパク質糖鎖中に含まれるグリコシド結合を全て切断し、单糖に遊離した。生じた单糖は標識化をした後、TSKgel ODS-80Ts QAカラム（東ソー社製、直径4.6 mm×7.5 cm）を用いたHPLCで分離し、305 nmの吸収で検出し、分析した。

分析の結果、NASに付加された糖鎖の糖組成は、マンノース/N-アセチルグルコサミン/フコース/キシロースがほぼ3/2/1/1の比であった。この結果、及び植物に一般的に見られる糖鎖構造を参考に推定されたNASに付加された糖鎖構造を図8に示す。

【実施例6】

【0058】

ネオクリンを構成するNASをコードする遺伝子を、以下の手順に従いクローニングした。

【0059】

(1) cDNAライブラリーの作成

材料には、クルクリゴ・ラチフォリアの果実（日本新薬（株） 山科植物資料館から提供された）を用いた。受粉4～8週後の果実約20.6 gを液体窒素によって凍結し、解凍しないように粉碎した。このようにして得た粉末20.6 gを試料として、mRNA Purification KIT (Amersham Bioscience社製) を用いてPoly(A)+mRNAを抽出した。

抽出したmRNA約4.5 μgからcDNA Synthesis Kit (Amersham Bioscience社製) を用いてcDNAライブラリーを作成した。cDNAはEcoRIアダプター連結でλZAPIIベクター (Stratagene社製) に挿入した。これをGiga p

ack III Gold Packaging Extract (Stratagene社製) を用いてファージにパッケージングし、大腸菌XL1-Blue MRF'に感染させたところ、約 1.2×10^5 個のplaquesから成るライブラリーを得た。

【0060】

(2) プローブの作成

凍結乾燥処理したクルクリゴ・ラチフォリアの果実20mgを材料とし、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社製) を用いてゲノムDNAを抽出した。特開平6-189771号公報で開示されているNBSのアミノ酸配列を元に配列表の配列番号4に記載のNC1Sプライマー、及び配列表の配列番号5に記載のNC1Aプライマーを合成し、抽出したゲノムDNAを鑄型としてPCR反応(94℃, 3分, 42℃, 3分、72℃, 3分を1サイクル、94℃, 30秒、42℃, 30秒、72℃, 1分を50サイクル)を行ったところ、NASの一部をコードする469bpのDNA断片が得られた。このDNA断片をプローブとして使用した。

【0061】

(3) プラーカハイブリダイゼーション

(1) で得たライブラリーのうち、 2×10^4 個のplaquesをナイロンメンブレンに移してDNAを固定した後、(2) で作成したプローブを用い、65℃でハイブリダイゼーションを行った。洗浄は0.1×SSC, 0.1% SDSを用い65℃で行った。その結果、約100個のplaquesがプローブとハイブリダイズした。強いシグナルを示す25個のplaquesについて、2次スクリーニングを行い、シングルplaquesに分離した。

【0062】

(4) 塩基配列の決定

(3) で得たシングルplaquesファージをヘルパーファージとXL1-Blue MRF'に共感染させin vivo excisionすることでλZAPIIベクターからインサートcDNAを含むpBlue script II SK (-) を切り出した。cDNAの塩基配列をジデオキシ法により決定した。

その結果、決定された塩基配列は配列表の配列番号1に示すとおりであった。配列表の配列番号1に示す塩基配列のうち、塩基番号70～408からなる塩基配列がコードするポリペプチドのアミノ酸配列は、実施例4で得られたNASのアミノ酸配列(配列表の配列番号3記載のアミノ酸配列)と一致していた。

また、配列表の配列番号1に示す塩基配列のうち、塩基番号4～477からなる部分には、CASのアミノ酸配列を含むオープソリーディングフレーム(ORF)が見出された。このことから、CASはシグナルペプチド及び延長ペプチドを含む前駆体ペプチド(PCAS)の形で産生されることが確認された。塩基番号4～477からなる塩基配列がコードするPCASのアミノ酸配列は、配列表の配列番号3に記載するとおりである。

【実施例7】

【0063】

ネオクリンを添加した野菜ジュースを、以下の手順に従い調製し、その味覚改変活性を評価した。

細かく切った新鮮なほうれん草135g、ピーマン65g、セロリ65g、及びレモン汁25gに水300mlを加えてミキサーで5分間懸濁し、これを孔径0.1mmのナイロンメッシュでろ過して、約400mlの野菜ジュースを得た。この野菜ジュース100mlに実施例1の精製ネオクリン粉末を50mg添加したものを高濃度添加野菜ジュース、10mg添加したものを低濃度添加野菜ジュースとし、無添加野菜ジュースを対照サンプルとして、パネラー4名により官能評価を行った。評価点は無添加野菜ジュースの苦味、えぐ味、及び甘味をそれぞれ0点とし、それぞれの味において、顕著に増強された時を2点、増強された時を1点、顕著に低減された時を-2点、低減された時を-1点とした。評価結果の平均値を表2に示す。

【0064】

【表2】

	苦味	えぐ味	甘味
無添加野菜ジュース	0	0	0
高濃度添加野菜ジュース	-1.75	-1.25	1.5
低濃度添加野菜ジュース	-1.0	-0.75	1.0

【0065】

表2の結果から、本発明のネオクリンは、苦味及びえぐ味を顕著に低減すると共に、甘味を付与することにより食品の嗜好を高める効果があることが確認された。

【実施例8】

【0066】

ネオクリンを添加したグレープフルーツ果汁を、以下の手順に従い調製し、その味覚改変活性を評価した。

グレープフルーツ果汁100mlに実施例1の精製ネオクリン粉末を10mg添加したものと高濃度添加サンプル、5mg添加したものと低濃度添加サンプルとし、無添加グレープフルーツ果汁を対照サンプルとして、パネラー4名により官能評価を行った。評価点は対象サンプルの苦味、酸味、及び甘味をそれぞれ0点とし、それぞれの味において、顕著に増強された時を2点、増強された時を1点、顕著に低減された時を-2点、低減された時を-1点とした。評価結果の平均値を表3に示す。

【0067】

【表3】

	苦味	酸味	甘味
無添加サンプル	0	0	0
高濃度添加サンプル	-1.75	-1.25	1.5
低濃度添加サンプル	-1.0	-0.5	0.75

【0068】

表3の結果から、本発明品のネオクリンは、苦味を顕著に低減すると共に、酸味を抑制し、甘味を付与することにより食品の嗜好を高める効果があることが確認された。

【実施例9】

【0069】

ネオクリンを添加した寿司ネタ用調味液を、以下の手順に従い調製し、その味覚改変活性を評価した。尚、ここでいう寿司ネタ用調味料とは、生のまま、又は一旦加熱処理した寿司用の寿司ネタに予め塗布したり、浸漬したりして寿司ネタを調味するための調味料である。

寿司ネタ用調味料の組成は、表4に示す通りとした。尚、寿司ネタ用調味料は、使用時は寿司ネタの種類、量に応じて適宜、水で希釀して用いるため、本実施例においては2倍希釀して用いた。

【0070】

【表4】

原材料	配合量（重量%）
醸造酢	1.8
還元水あめ	1.3
pH調整剤	8
調味料（アミノ酸）	4
食塩	4
水	5.3

【0071】

希釀済寿司ネタ用調味液100mlに、実施例1の精製ネオクリン粉末11.3mgを出証特2005-3007382

添加してネオクリン添加調味液を得た。このネオクリン添加調味液に海老を20分間浸漬して海老の寿司ネタ（ネオクリン添加サンプル）を得た。一方、ネオクリン粉末を添加しないままの希釀済寿司ネタ用調味液にも同様に海老を浸漬して海老の寿司ネタ（対照サンプル）を得た。パネラー4名が、ネオクリン添加サンプル及び対照サンプルを各一尾ずつ食することにより、各サンプルのえぐ味の強さを評価した。その結果、ネオクリン添加サンプルは、対照サンプルに比べて、えぐ味が顕著に抑制されたことが確認された。

【実施例10】

【0072】

ネオクリンの味覚改変活性とクルクリンの味覚修飾活性とを、以下の手順で比較した。

【0073】

(1) クルクリンの調製

まず、特開平6-189771号公報の実施例1～12において開示されている方法により、クルクリンBを発現させた。

その後、クルクリンBを発現している形質転換大腸菌を超音波発生装置により破壊した懸濁液を、50 mM塩化ナトリウムを含む25 mMリン酸緩衝液(pH 6.8)を用いて遠心分離により4回洗浄した。これを8M尿素、10 mM DTTを含む500 mMトリス塩酸緩衝液(pH 9.5)に溶解し、37℃で2.5時間還元した。この溶液に、10倍量の8M尿素、0.11 M酸化型グルタチオンを含む500 mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.5)を添加し、室温で3時間静置し、タンパク質をグルタチオン化した。このグルタチオン化タンパク質に、10倍量の4 mMシステインを含む50 mMトリス塩酸緩衝液(pH 9.0)を添加し、4℃で2日間反応させた後、0.1 M塩化ナトリウムを含む50 mMリン酸緩衝液(pH 6.8)に透析することでホモダイマーを形成させた。その後、凍結乾燥することで、クルクリンBのホモダイマーであるクルクリン粉末を得た。

【0074】

クルクリンBがホモダイマーを形成していることは、SDS-PAGEで確認した。すなわち、クルクリン粉末10 μgを、ゲル濃度15%でSDS-PAGE後、CBB染色を行ったところ、図9に示す通り、非還元下で約20 kDaの位置に単一バンドが見られ、還元下では約11 kDaの位置に1本のバンドが見られることを確認した。該ホモダイマー、クルクリンを用いて以下の官能検査を行った。

【0075】

(2) 味覚改変活性及び味覚修飾活性の比較

実施例1で得た精製ネオクリンを、30、50、75、100 μg/m1の各濃度となるように、また、(1)で得たクルクリンを、100 μg/m1となるように、水に溶解した。100 μg/m1クルクリン溶液500 μlを口に含み、溶液を吐き出した後、0.1% (v/v) 酢酸を口に含んだ時の甘さを基準として、各濃度のネオクリン溶液500 μlを口に含み、溶液を吐き出した後、0.1% (v/v) 酢酸を口に含んだ時の甘さをパネラー3名で評価した。その際、クルクリン溶液時の甘さに比べて、同等の甘味の時は0点、やや甘味が強い時は1点、甘味が強い時は2点、著しく甘味が強い時は3点、やや甘味が弱い時は-1点、甘味が弱い時は-2点、著しく甘味が弱い時は-3点とした。評価結果の平均値を表5に示す。

【0076】

【表5】

	ネオクリン濃度 (μg/m1)			
	30	50	75	100
評価点	1.33	2.33	2.5	3.0

【0077】

表5の結果から、ネオクリンの有する味覚改変活性は、クルクリンの味覚修飾活性よりも著しく強いことが確認された。

【産業上の利用可能性】

【0078】

本発明により、優れた味覚改変活性を有し、クルクリンとは異なりヘテロダイマー構造を取る新規な二量体タンパク質ネオクリンが提供され、当該タンパク質を用いて、食品等に実用可能な新規な味覚改変組成物を提供することが可能となった。

また、本発明により、当該タンパク質を構成するサブユニットのアミノ酸配列が提供され、このアミノ酸配列通りに、適当な合成方法によって当該タンパク質を提供することが可能となった。さらには、本発明により、当該タンパク質をコードする遺伝子のDNAが提供されたことで、適当な宿主を選び、遺伝子工学技術を用いても当該タンパク質を提供することが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1】ネオクリン精製粉末を還元下又は非還元下でSDS-PAGEに供し、CBB染色した時の図である。

【図2】NAS及びNBSの精製粉末をSDS-PAGEに供し、CBB染色した時の図である。

【図3】S-カルボキシアミドメチル化NASのchymotrypsin消化ペプチドのHPLC溶出パターンの図である。

【図4】S-カルボキシアミドメチル化NASのendoproteinase Asp-N消化ペプチドのHPLC溶出パターンの図である。

【図5】S-カルボキシアミドメチル化NASのtrypsin消化により遊離したアミノ酸の定量分析の図である。

【図6】S-カルボキシアミドメチル化NAS(1nmol)のcarboxypeptidase A消化により遊離したアミノ酸の定量分析の図である。

【図7】NASのアミノ酸配列を示す。

【図8】NASに付加された糖鎖の糖組成分析から推定された糖鎖構造を示す。

【図9】クルクリンを還元下又は非還元下でSDS-PAGEに供し、CBB染色した時の図である。

【符号の説明】

【0080】

図7において、4行目のNはN末端から決定したアミノ酸配列部分を示し、C1～14はchymotrypsin消化から得られたペプチドのアミノ酸配列部分を示し、D1～4は、endoproteinase Asp-N消化から得られたペプチドのアミノ酸配列部分を示し、T1～4はtrypsin消化から得られたペプチドのアミノ酸配列部分を示す。また、←はC末端から得られた配列を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsukan Group Corporation

<120> New taste modifying protein and DNA encoding same, and application of the same

<130> P161440K

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 591

<212> DNA

<213> Curculigo latifolia

<400> 1

acaatggcgg ccaagttct ttcaccatt ctgtcaccc ttgcggccgt cgcttagcctt 60

ggcatggccg acagtgtcct gctctccggg caaaactctgt atgccggcca ctccctcacg 120

tcgggcagct atacctaacc cataaaaaac aactgcaacc tggtgaaata ccagcacggg 180

aggcagatct gggctagcga cactgacggg cagggctccc aatgccgcct cacattgcgg 240

agtgacggga acctcattat ctacgacgac aacaacatgg tcgtgtgggg gagcgactgc 300

tgggggaaca acggcacgta tgctttgtt ctgcggcagg atggccttt tgtcatctat 360

ggcccggttt tgtggccct tggcctaatt gggtgccgca gtcttaatgg taaaatcaca 420

gttgctaagg attctactga accacaacat gaggatatta agatggtgat taataattaa 480

tcaagtgaga ggattgttat gagaataatg aggaaatgga agaccaatct catgtcggtg 540

tggcctatct cgacctgttt gcagtgcctt tgtaaaata acacattgct t 591

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> Curculigo latifolia

<400> 2

Asp Ser Val Leu Leu Ser Gly Gln Thr Leu Tyr Ala Gly His Ser Leu

1

5

10

15

Thr Ser Gly Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Gln Asn Asn Cys Asn Leu Val
 20 25 30

Lys Tyr Gln His Gly Arg Gln Ile Trp Ala Ser Asp Thr Asp Gly Gln
 35 40 45

Gly Ser Gln Cys Arg Leu Thr Leu Arg Ser Asp Gly Asn Leu Ile Ile
 50 55 60

Tyr Asp Asp Asn Asn Met Val Val Trp Gly Ser Asp Cys Trp Gly Asn
 65 70 75 80

Asn Gly Thr Tyr Ala Leu Val Leu Gln Gln Asp Gly Leu Phe Val Ile
 85 90 95

Tyr Gly Pro Val Leu Trp Pro Leu Gly Leu Asn Gly Cys Arg Ser Leu
 100 105 110

Asn

<210> 3
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> Curculigo latifolia

<400> 3

Met Ala Ala Lys Phe Leu Leu Thr Ile Leu Val Thr Phe Ala Ala Val
 1 5 10 15

Ala Ser Leu Gly Met Ala Asp Ser Val Leu Leu Ser Gly Gln Thr Leu
 20 25 30

Tyr Ala Gly His Ser Leu Thr Ser Gly Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Gln
 35 40 45

Asn Asn Cys Asn Leu Val Lys Tyr Gln His Gly Arg Gln Ile Trp Ala

出証特2005-3007382

50 55 60

Ser Asp Thr Asp Gly Gln Gly Ser Gln Cys Arg Leu Thr Leu Arg Ser
65 70 75 80

Asp Gly Asn Leu Ile Ile Tyr Asp Asp Asn Asn Met Val Val Trp Gly
85 90 95

Ser Asp Cys Trp Gly Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Leu Val Leu Gln Gln
100 105 110

Asp Gly Leu Phe Val Ile Tyr Gly Pro Val Leu Trp Pro Leu Gly Leu
115 120 125

Asn Gly Cys Arg Ser Leu Asn Gly Glu Ile Thr Val Ala Lys Asp Ser
130 135 140

Thr Glu Pro Gln His Glu Asp Ile Lys Met Val Ile Asn Asn
145 150 155

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer NC1S

<400> 4

atggcggcca agtttcttct cac

23

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer NC1A

<400> 5

taatcaccat cttaatatcc tcatg

25

<210> 6

<211> 114

<212> PRT

<213> Curculigo latifolia

<400> 6

Asp Asn Val Leu Leu Ser Gly Gln Thr Leu His Ala Asp His Ser Leu
1 5 10 15

Gln Ala Gly Ala Tyr Thr Leu Thr Ile Gln Asn Lys Cys Asn Leu Val
20 25 30

Lys Tyr Gln Asn Gly Arg Gln Ile Trp Ala Ser Asn Thr Asp Arg Arg
35 40 45

Gly Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Ser Asp Gly Asn Leu Val Ile
50 55 60

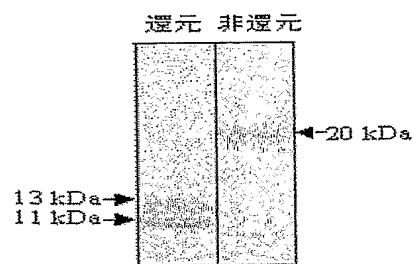
Tyr Asp His Asn Asn Asp Val Trp Gly Ser Ala Cys Trp Gly Asp
65 70 75 80

Asn Gly Lys Tyr Ala Leu Val Leu Gln Lys Asp Gly Arg Phe Val Ile
85 90 95

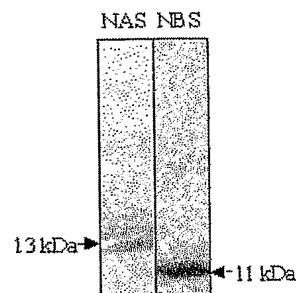
Tyr Gly Pro Val Leu Trp Ser Leu Gly Pro Asn Gly Cys Arg Arg Val
100 105 110

Asn Gly

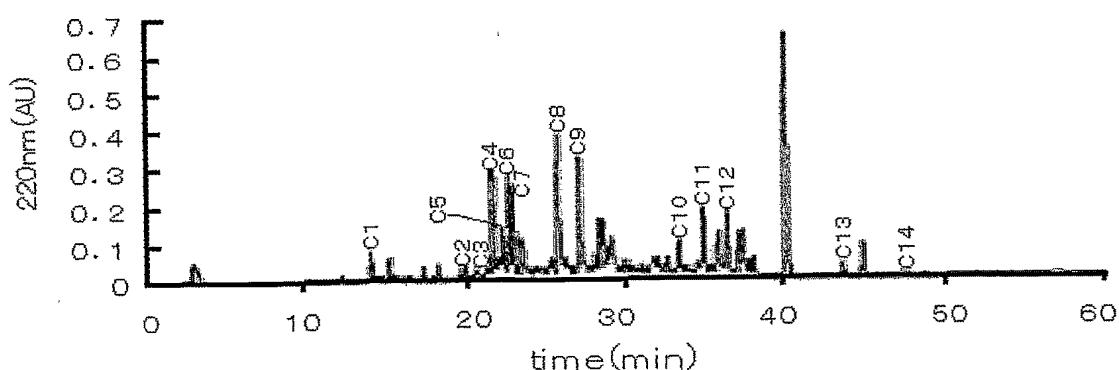
【書類名】 図面
【図 1】



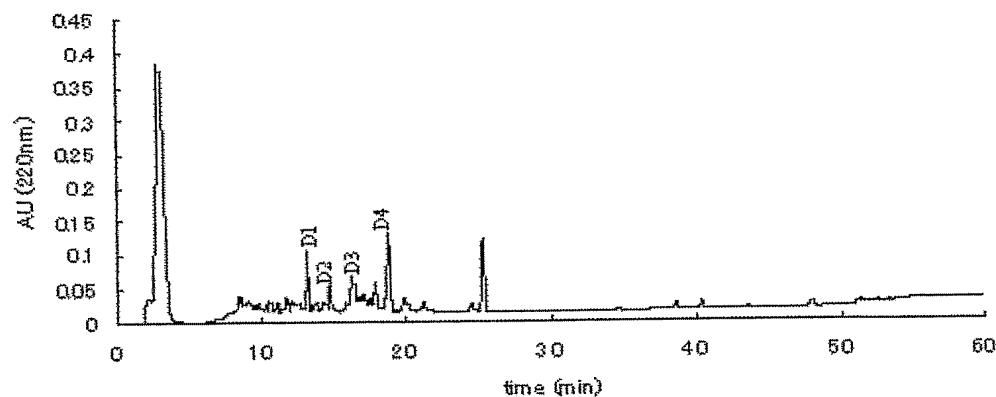
【図 2】



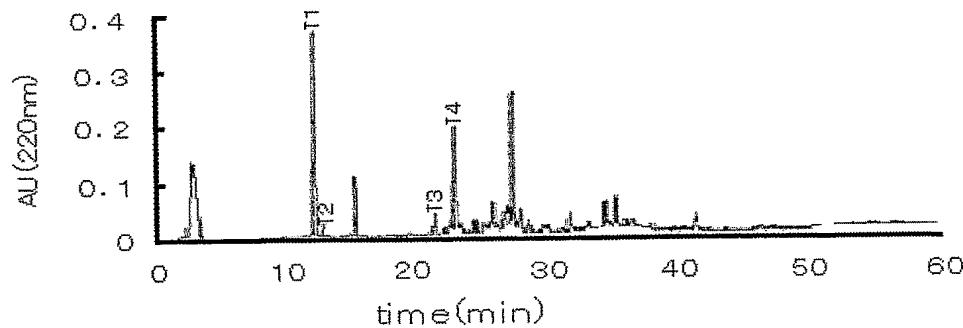
【図 3】



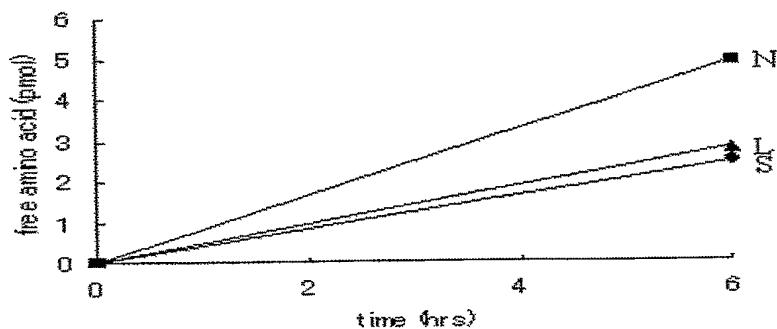
【図4】



【図5】



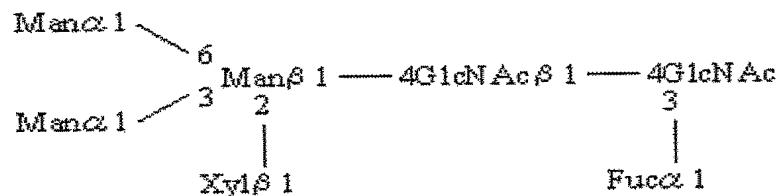
【図6】



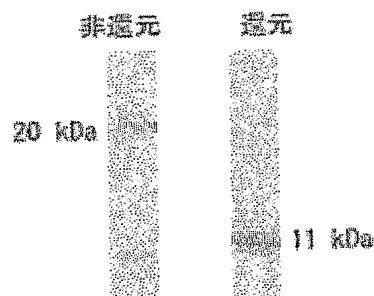
【図 7】

DSVLL SGQTL YAGHS LTSGS YTLTI QNNCN LVKYQ HGRQI
 C6 C4 C9 C8
 D3 N C9 T1
 WASDT DGQGS QCRLT LRSDG NL IY DDNNM VVWGS DCWGN
 C2 C10 C5
 D2 C11 D1
 T4 D2 T3
 NGTYA LVLQQ DGLFV IYGPV LWPLG LNGCR SLN
 C1 C12 C7 C13 C3 ←
 C14 T2

【図 8】



【図 9】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 より優れた味覚改変機能を有する物質を見出し、該味覚改変物質の構造を決定すると共に、遺伝子レベルにおいても解明し、当該物質の一次構造、並びにこれをコードする遺伝子を取得するとともに、当該味覚改変物質を含むことを特徴とする新規な味覚改変組成物を提供すること。

【解決手段】 下記の（A）、又は（B）に示すポリペプチドN A S、該ポリペプチドN A SとポリペプチドN B Sとからなり、味覚改変活性を有することを特徴とする二量体タンパク質ネオクリン。

（A）配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

（B）配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ポリペプチドN B Sと共に味覚改変活性を有する二量体ネオクリンを形成しうるポリペプチド

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2004-019251
受付番号	50400136600
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成16年 1月29日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成16年 1月28日
-------	-------------

特願2004-019251

出願人履歴情報

識別番号

[398065531]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

1998年10月20日

新規登録

愛知県半田市中村町2丁目6番地

株式会社ミツカングループ本社